

УДК 576.35:576.314

ЦИТОЛОГИЯ

В. А. РОЗЕНБЛАТ, А. С. СЕРПИНСКАЯ, А. А. СТАВРОВСКАЯ

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК, РЕЗИСТЕНТНЫХ  
К КОЛХИЦИНУ, ПРИ ПОМОЩИ НЕИОНОГЕННОГО ДЕТЕРГЕНТА  
ТВИНА-80

(Представлено академиком А. С. Спириным 21 XI 1973)

Изучение повышенной устойчивости малигнанизированных клеток к различным агентам, в частности к веществам, применяемым в химиотерапии опухолей, представляет интерес как в практическом, так и в теоретическом плане. В настоящей работе изучается механизм резистентности сублинии мышечных клеток L к колхицину и колцемиду.

Колхицин, как и его производное колцемид, является веществом, избирательно разрушающим микротрубочки. Такая избирательность действия препарата обусловлена тем, что он специфически связывается с белком микротрубочек тубулином. В работе использована резистентная к колцемиду и колхицину сублиния мышечных клеток L (сублиния L-53), поддерживаемая *in vitro* в присутствии 0,54  $\mu M$  (0,2  $\mu g/ml$ ) колцемида (<sup>1</sup>). Прежде мы показали, что клетки сублиний L-53 более устойчивы, чем клетки исходной линии L, к митостатическому действию колхицина и колцемида (<sup>1</sup>) и что они гораздо хуже накапливают  $H^3$ -колхицин (<sup>2</sup>). Было показано также, что разницу в накоплении колхицина чувствительными и резистентными клетками, по-видимому, нельзя объяснить неодинаковым связыванием препарата с тубулином (<sup>2</sup>). Полученные данные позволили предположить, что возникновение резистентности клеток L-53 к митостатикам связано с изменением проницаемости клеточной мембранны. В связи с этим возник вопрос, нельзя ли, воздействуя на клетки агентами, изменяющими проницаемость их мембранны, повысить чувствительность клеток L-53 к колхицину и колцемиду и уменьшить различия между клетками L и L-53 в накоплении колхицина.

В настоящей работе сравнивается действие на клетки L и L-53 неионогенного детергента твина-80. Существуют данные о том, что твин усиливает проникновение в клетки некоторых веществ (<sup>3</sup>) и способен уменьшать степень резистентности клеток к актиномицину D и дауномицину (<sup>4</sup>). Мы изучали, как влияет твин-80 на накопление клетками меченого колхицина, на чувствительность веретена деления клеток к митостатикам и на жизнеспособность клеток. Методы культивирования клеток L и L-53, определения накопления  $H^3$ -колхицина в клетках и их чувствительности к митостатическому действию препаратов описаны ранее (<sup>2</sup>) (см. также подписи к рисункам и таблице). На рис. 1 представлены результаты одного из опытов, в которых оценивалось накопление  $H^3$ -колхицина клетками L и L-53 в зависимости от концентрации твина-80 в среде. Видно, что с повышением концентрации детергента растет и количество меченого митостатика, накапливаемого клетками за 2 часа. Аналогичные данные получены также и для больших, чем 2 часа, сроков инкубации клеток с детергентом и  $H^3$ -колхицином. Количество колхицина, накапливаемого клетками за 24 часа, вырастает под действием твина во столько же раз, что и за 2 часа. Ранее было показано, что количество колхицина в клетках растет линейно в первые часы инкубации с митостатиком и примерно за сутки достигает максимального значения (<sup>2</sup>). Таким образом, твин-80 повышает как на-

чальную скорость, так и максимальный уровень накопления колхицина. В культуре клеток L-53 количество  $\text{H}^3$ -колхицина, накапливаемое клетками, возрастает под влиянием твина сильнее, чем в культуре клеток L. Так, при добавлении 0,1% твина количество митостатика превосходит исходное (без твина) примерно в 30 раз для клеток L-53 и только в 4 раза для клеток L (рис. 1a). Начиная с дозы детергента 0,01%, отношение накопления митостатика в клетках L-53 к накоплению в клетках L резко увеличивается (рис. 1b). Иными словами, под действием твина-80 разница в накоплении препарата между чувствительными и резистентными клетками уменьшается.

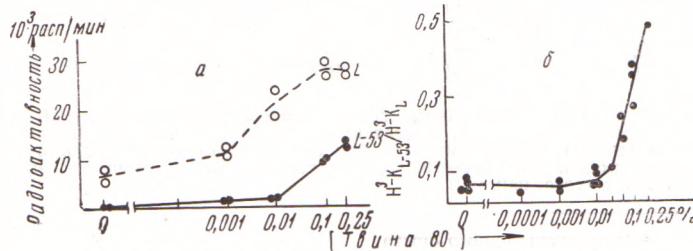


Рис. 1. Влияние твина-80 на накопление  $\text{H}^3$ -колхицина клетками L и L-53 за 2 часа. Клетки в матрасах ( $\approx 3 \text{ млн}/20 \text{ см}^2$ ) инкубировали 2 часа при  $37^\circ$  с твионом-80 («Lawson») и  $0,25 \mu\text{M}$   $\text{H}^3$ -колхицином (Radiochemical Centre, «Amersham»), после чего отмывали от внеклеточной метки и растворяли в смеси 0,125% трипсина и 0,5% триглицеридазы X-100 («Serva»), как в (2). а – радиоактивность, накапливаемая 1 млн клеток (один из опытов); б – отношение количества  $\text{H}^3$ -колхицина ( $\text{H}^3\text{-K}$ ), накопленного клетками L-53, к количеству  $\text{H}^3$ -колхицина, накопленного в клетках L

Наряду с увеличением поглощения колхицина, твин повышает также и собственно чувствительность резистентных клеток L-53 к митостатикам. Как известно, разрушая веретено деления, колхицин и колцемид задерживают делящиеся клетки в метафазе, в результате чего уменьшается доля клеток в постметафазных стадиях митоза (ана- и телофазе). Результаты опытов по изучению митостатического действия колцемида на клетки L-53 в присутствии твина-80 суммированы в табл. 1. Колцемид в концентрации  $0,54 \text{ M}$  лишь слегка снижает долю клеток L-53 в постметафазных стадиях митоза, тогда как для клеток L эта доза является полностью митостатической<sup>(5)</sup>. При добавлении твина в концентрации 0,01% и выше та же доза колцемида вызывает полный метафазный блок в клетках L-53 (табл. 1). Сам твин, как видно из таблицы, не задерживает клетки в метафазе. Обращает на себя внимание то, что при применении 0,1-процентного раствора твина исчезновение постметафазных стадий происходит позже, чем при меньших концентрациях детергента. Это объясняется, по-видимому, токсическим действием очень высоких доз твина на клетки. Сходные данные получены в опытах с другим метафазным ядом – колхицином: твин-80 усиливал митостатическое действие этого препарата на клетки L-53.

Вызываемое твионом снижение различий в накоплении колхицина между клетками L и L-53 не связано с грубыми, неспецифическими нарушениями жизнедеятельности клеток. Чтобы показать это, мы добавляли твин-80 в культуры клеток L и L-53 на 4–7 суток. Рост культур клеток L, оказавшихся более чувствительными к детергенту, подавлялся дозой 0,05%, а рост клеток L-53 – дозой 0,1%. Дозы твина 0,01% и 0,025%, уже уменьшающие разницу в накоплении колхицина чувствительными и резистентными клетками, еще не нарушают жизнеспособности ни тех, ни других клеток. Мы показали также, что клетки L-53 остаются жизнеспособными и при совместном применении твина с колцемидом. После двухчасовой инкубации клеток с колцемидом ( $0,54 \mu\text{M}$ ) и твионом (0,05%) достаточно

Таблица 1

Влияние твина-80 на митостатическое действие колцемида на клетки L-53 (% постметафазных клеток)

Концентрация твина-80 в среде, %	Время инкубации			
	2 часа (I)	4 часа (I)	2 часа (II)	4 часа (II)
0	53±2	—	34±6	37±5
0,001	59±7	—	40±6	—
0,01	51±5	49±7	1±0,5	0,2±0,2
0,025	—	—	0 *	—
0,05	—	54 *	5±5	—
0,1	54±4	46 *	41±3	5±3

П р и м е ч а н и е. Концентрация колцемида в II — 0,54  $\mu\text{M}$ , в I колцемид отсутствовал. Представлены средние данные по нескольким опытам ± выборочные ошибки среднего. В каждом опыте на точку подсчитали 100—200 делящихся клеток, учитывая разные стадии митоза, как в (5).

\* Результаты одного опыта.

удалить из среды лишь один из препаратов для того, чтобы клетки начали выходить из метафазного блока и нормально продолжать митоз.

Итак, твин-80 усиливает митостатическое действие колцемида и колхицина и поглощение меченого колхицина клетками. Накопление митостатика в резистентных клетках повышается гораздо сильнее, чем в клетках L. Таким образом, разница в накоплении препарата чувствительными и резистентными клетками под действием твина-80 уменьшается. По данным ряда авторов, многие детергенты действуют на плазматическую мембрану клеток, делая ее более проницаемой для различных молекул (3, 4). В данной работе показано, что можно уменьшить разницу в накоплении колхицина между клетками L и L-53, обрабатывая их твином-80. Результаты нашей работы хорошо согласуются с высказанным ранее предположением о том, что возникновение резистентности клеток L-53 к колхицину и колцемиду связано с изменением проницаемости клеточной мембраны (2). Однако строго доказанным это предположение считать нельзя.

Институт экспериментальной  
и клинической онкологии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пущино-на-Оке

Поступило  
12 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. C. Ставровская, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 76, 9, 143 (1973). <sup>2</sup> В. А. Розен-  
блат, А. С. Серпинская, А. А. Ставровская, ДАН, т. 211, 1460 (1973). <sup>3</sup> Е. А. Модянова,  
Ю. М. Васильев, Цитология, т. 7, 410 (1965). <sup>4</sup> M. E. Hodes, C. G. Palmer, A. Warren,  
Exp. Cell Res., v. 21, 164 (1950). <sup>5</sup> А. А. Ставровская, Е. С. Каплакова, С. Л. Любский,  
Цитология, т. 14, 213 (1972). <sup>6</sup> H. Riehm, J. Biedler, Cancer Res., v. 32, 1195 (1972).